Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. W. Seitz

# ZUR HEPARINHEMMUNG DER RIBONUCLEASE UND ENTWICKLUNG EINER ENZYMATISCHEN BESTIMMUNGSMETHODE FÜR HEPARIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gerd Hobom
aus Bomlitz/Walsrode

München 1962

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. N. Zöllner

Korreferent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. W. Seitz

Tag der mündlichen Prüfung: 31.7.1962

Sonderdruck
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 335, S. 117–124, 1964
Walter de Gruyter & Co., Berlin

## Zur Heparinhemmung der Ribonuclease

# Entwicklung einer enzymatischen Bestimmungsmethode für Heparin*

Von

**Gerd Hobom** und **Nepomuk Zöllner**

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. W. Seitz)

(Der Schriftleitung zugegangen am 5. März 1962)

Für die Bestimmung von Heparin in biologischen Systemen werden chemische und gerinnungsphysiologische Methoden benützt. Die ersteren wie die Carbazolreaktion[1] oder das Metachromasieverfahren[2] verwenden Farbreaktionen der Zuckerreihe, erfassen also die Gruppe der uronsäurehaltigen Mucopolysaccharide nur gemeinsam (mit unterschiedlichem empirischem Faktor). Sie werden außerdem durch im Überschuß anwesende Aminosäuren oder auch Proteine gestört. Nur wo die anderen Mucopolysaccharide, wie z. B. im Serum, praktisch fehlen, können die Ergebnisse der Gruppenreaktion auf das Heparin bezogen werden.

Alle gerinnungsphysiologischen Methoden, insbesondere die Bestimmung der Thrombinzeit, sind empirisch auf ein System nicht völlig definierter Fraktionen aufgebaut, und der Rückschluß aus diesem Wechselwirkungssystem auf die Konzentration eines Stoffes wie Heparin (einschließlich der Eingrenzung als protaminaufhebbarer Teil einer Verzögerung) ist angreifbar. Der hohe klinische Wert dieser Methoden, und selbst der einfachen „Gerinnungszeit", für einen Einblick in die Gerinnungsverhältnisse und den Erfolg einer eventuellen Heparinisierung bleibt dabei unberührt.

Zöllner und Fellig[3] sowie gleichzeitig und unabhängig davon Roth[4] fanden eine Hemmwirkung von Heparin auf die Ribonucleasereaktion. Diese kompetitive[3] Hemmung wurde als für Heparin spezifisch angesehen. Später fand man eine größere Anzahl durchweg synthetischer

* Verwendete Abkürzungen: C·p, U·p für die „offenen" 3′-Pyrimidinnucleotide; C:p, U:p für die cyclischen 2′.3′-Pyrimidinnucleosidphosphate; RNA für Ribonucleinsäure.

[1] Z. Dische, Methods biochem. Analysis **2**, 313 [1951].

[2] F. C. McIntosh, Biochem. J. **35**, 776 [1941].

[3] N. Zöllner u. J. Fellig, Naturwissenschaften **39**, 523 [1952]; Amer. J. Physiol. **173**, 223 [1953].

[4] J. S. Roth, Federat. Proc. **11**, 277 [1952]; Arch. Biochem. Biophysics **44**, 265 [1953].

Stoffe[5] aus der Gruppe der Makropolyanionen[6] mit gleicher Hemmwirkung gegenüber Ribonuclease und verwandten Enzymen.

Wir benutzten die Hemmung der enzymatischen Hydrolyse von cyclischen Pyrimidinnucleosidphosphaten zur Entwicklung einer Mikrobestimmungsmethode für Heparin in Gegenwart anderer Mucopolysaccharide[7]. Die gleiche Reaktion ließ sich auch für die Bestimmung der Enzymkonzentration verwenden[8]. Die Hydrolyse der 2′.3′-cyclischen Pyrimidinnucleosidphosphate, d. h. die zweite Phase der enzymatischen Wirksamkeit wurde der direkten RNA-Spaltung[9] vorgezogen, weil hier durch das niedermolekulare Substrat besser definierte Verhältnisse vorliegen und weil die inhibitorische Wirksamkeit von Heparin auf dieser Stufe erheblich größer[10, 11] ist.

## Methodik und Ergebnisse

Bei der Hydrolyse des cyclischen Uridyl-2′.3′-phosphats (U:p) zum offenen 3′-Phosphat (U·p) werden Protonen frei, die titriert werden können. Es wird deshalb bei konstantem pH mit einem Autotitrator (Potentiostat, pH-stat) oder einer entsprechenden manuellen Anordnung aus pH-Meter (Beckman-H2), Mikrobürette und Stoppuhr gearbeitet.

Zu 1 m*l* Substratlösung mit 15 $\mu$Mol (5,6 mg) Bariumsalz von U:p bzw. C:p (Schwarz Laboratories, Mount Vernon, N. Y.) und 1 m*l* einer NaCl-Lösung (zum Erreichen der gewählten Ionenstärke) wird Heparin oder eine andere Substanz zugesetzt und mit Wasser auf 2,9 m*l* aufgefüllt. Wenn sich ein konstanter pH-Wert eingestellt hat, wird die Reaktion durch Zugabe von 0,10 m*l* Enzymlösung (10 $\mu$g Ribonuclease) gestartet, zugleich die NaOH-Bürette mit ihrer Spitze in die Lösung eingetaucht, die von einem kleinen magnetischen Rührer bewegt wird. Die zugesetzten Mengen an 0,005*n* NaOH werden zeitlich verfolgt.

Die erhaltenen Kurven[12, 13] zeigen den erwarteten linearen Verlauf über die gesamte Reaktionszeit von 10 bis 15 Min., wenn man von unvermeidlichen Schwankungen zum Zeitpunkt des Starts absieht.

In diesem Reaktionsansatz wurden die Konzentrationen aller Komponenten einzeln nach oben und unten um insgesamt eine Zehnerpotenz variiert, ohne daß innerhalb dieses Bereiches eine Abweichung von dem linearen Reaktionsverlauf

---

[5] N. Zöllner, B. Lorenz u. R. Lorenz, Z. ges. exp. Med. **133**, 144 [1960]; P. T. Mora u. B. G. Young, Arch. Biochem. Biophysics **85**, 6 [1959]; J. Fellig u. C. E. Wiley, ebenda **85**, 313 [1959]; H. Heymann, Z. R. Gulick, J. DeBoer, G. de Stevens u. R. L. Mayer, ebenda **73**, 366 [1957].

[6] P. C. Spensley u. H. J. Rogers, Nature [London] **173**, 1190 [1954].

[7] N. Zöllner u. B. Lorenz, in H. U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, S. 79, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1962.

[8] N. Zöllner u. G. Hobom, l. c.[7], S. 793.

[9] M. Kunitz, J. gen. Physiol. **24**, 15 [1940]; J. biol. Chemistry **164**, 563 [1946]; C. B. Anfinsen, ebenda **207**, 201 [1954]; S. R. Dickman u. K. Trupin, Arch. Biochem. Biophysics **82**, 355 [1959].

[10] L. Vandendriessche, Arch. Biochem. Biophysics **65**, 347 [1956].

[11] F. F. Davis u. F. W. Allen, J. biol. Chemistry **217**, 13 [1955].

[12] J. P. Hummel, M. Flores u. G. Nelson, J. biol. Chemistry **233**, 717 [1958].

[13] G. Hobom, Dissertat., Univ. München 1962.

auftritt. Insbesondere ist die Umsatzrate linear von der zugesetzten Enzymmenge abhängig; auch bei der vierfachen Enzymkonzentration besteht noch volle Sättigung. Begrenzend ist die Produkthemmung. Wie Vorversuche[13] unter Zusatz des Reaktionsproduktes ergaben, überschreitet bis zu einem Gesamtumsatz von 2% der Substratmenge die Hemmung durch das entstehende Produkt[11, 14] noch nicht die sonstigen Fehler der Bestimmungsmethode. Die Fehler aus der parallelen Abnahme der Substratmenge während der Reaktion sind demgegenüber zu vernachlässigen. Eine Verbesserung durch Verdoppelung der Substratmenge und damit eine Beschränkung der ausgewerteten Umsatzrate auf 1% verbieten die Kosten für die cyclischen Nucleosidphosphate.

Der Empfindlichkeit des Enzyms gegen Schwermetallspuren[11] trägt man Rechnung durch Zusatz von Äthylendiamin-tetraacetat (12 $\mu$g pro 10 $\mu$g Enzym, ausreichend für einen vollständigen Schutz[13] gegen etwa 0,5 $\mu$g$Cu^{2\oplus}$).

Bei einer Konzentration von 0,005*m* Substrat (15 $\mu$Mol/3 m*l*) bleibt die Lösung außerdem sicher unter der angegebenen[15] Schwelle von 0,045*m*, bei der eine Synthese: 2 C:p ⟶ C·pC:p nachweisbar wird. Eine solche Nebenreaktion, die nicht zur Freisetzung eines Säureäquivalents führt, muß vermieden werden.

Die Heparinhemmung wächst mit fallendem pH-Wert und sinkender Ionenstärke $\mu$ (Abb. 2). Gleichzeitig sinkt jedoch die Reaktionsgeschwindigkeit der ungehemmten Reaktion und damit die Genauigkeit der Bestimmung. Die freigesetzte Monoesterphosphatgruppe geht in Abhängigkeit vom pH in wechselndem Maße selbst in die Pufferkapazität des Systems ein, so daß die Titration nur einen Teil des zu erwartenden einen Äquivalents Säure erfaßt. Mit sinkendem pH wächst der Anteil

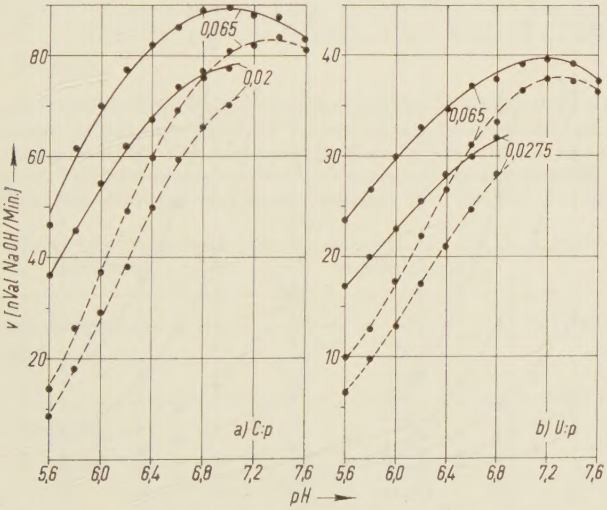


Abb. 1. Einfluß von pH und Ionenstärke auf die ungehemmte Hydrolyse von cyclischem 2′.3′-Cytosin-phosphat (a) und 2′.3′-Uridin-phosphat (b) durch Ribonuclease. Der 3-m*l*-Ansatz enthielt 10 $\mu$g Ribonuclease und 15 $\mu$Mol Substrat. Die Zahlen an den Kurven geben die Ionenstärke an, die ausgezogenen Kurven bedeuten korrigierte, die gestrichelten unkorrigierte Werte.

[14] H. Edelhoch u. J. Coleman, J. biol. Chemistry **219**, 351 [1956].
[15] L. A. Heppel u. R. R. Whitfeld, Biochem. J. **60**, 8 [1955].

des primären gegenüber dem sekundären Phosphat und damit der des nicht erfaßten Produktes. Auch dadurch wird die Genauigkeit der Bestimmung bei niederen pH-Werten eingeschränkt. In Abb. 1 ist zur Kennzeichnung beider Einflüsse in Abhängigkeit vom pH sowohl die gemessene Umsatzgeschwindigkeit (unkorrigiert: gestrichelte Kurven) als auch die tatsächliche Umsatzrate des Enzyms (korrigiert: ausgezogene Kurven) nach der Beziehung: $pH = pK + \lg [X_b/(1\text{-}X_b)]$ eingetragen.

$X_b$ stellt den relativen Anteil (Molenbruch) der Protolytbase an der Gesamtkonzentration dar. Die in die Gleichung einzusetzenden $pK$-Werte für die Pyrimidin-nucleotide in bezug auf die zweite Stufe ihrer Phosphorsäuredissoziation sind für U·p 5,88, für C·p 5,97[16]. Für reine Vergleichsmessungen unter standardisierten Bedingungen[7, 8] wird eine Korrektur entbehrlich.

Bei der Ionenstärke $\mu = 0{,}020$ macht deren Zunahme durch die ionenproduzierende Hydrolyse etwa 2% aus; die dadurch bedingte methodische Abweichung verschwindet noch in der allgemeinen Fehlerbreite. Als Maß für die Hemmung durch Heparin dient der Quotient

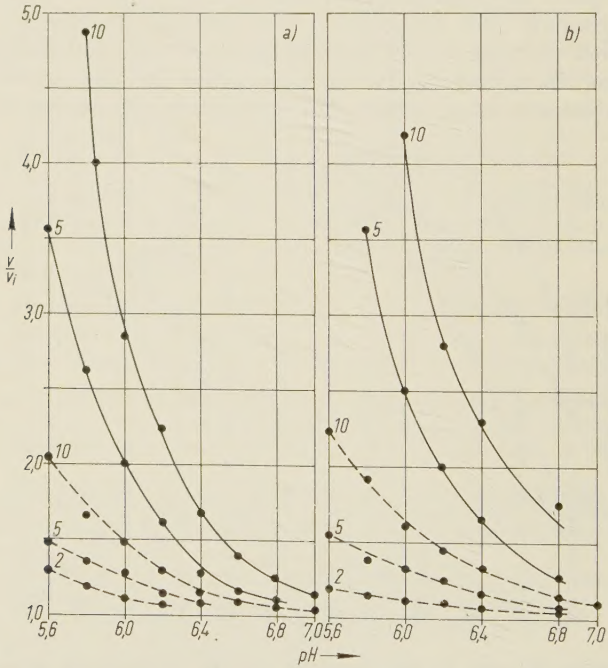


Abb. 2. Heparinhemmung der Hydrolyse von cyclischem 2′.3′-Cytosin-phosphat (a) und 2′.3′-Uridin-phosphat (b) in Abhängigkeit vom pH-Wert. Ansatz s. Abb. 1. Die Zahlen an den Kurven geben die eingesetzte Menge Heparin in $\mu$g an. ———: $\mu = 0{,}020$ (a), $\mu = 0{,}0275$ (b); - - - - -: $\mu = 0{,}065$.

[16] W. E. Cohn in E. Chargaff u. J. N. Davidson, The Nucleic Acids, Bd. I, S. 217, Academic Press Inc., Publ., New York 1955.

aus den Geschwindigkeiten der gehemmten ($v_i$) und der ungehemmten ($v$) Reaktion. Abb. 2 zeigt diese reziproke relative Reaktionsgeschwindigkeit ($v/v_i$) in Abhängigkeit vom pH und der Ionenstärke $\mu$.

Zu allen „zentralen" Bedingungen (pH, Ionenstärke, Heparinkonzentration usw.) wird eine Statistik über eine Serie gleichartiger Versuche aufgestellt, deren Anzahl so gewählt ist, daß ihre (einfache) mittlere Abweichung $\pm$ 5% nicht überschreitet. Nur die Mittelwerte solcher Reihen sind in den Kurven berücksichtigt.

Abb. 3 zeigt die lineare Abhängigkeit der Inhibitorwirkung von der Heparinkonzentration an einigen ausgewählten Beispielen für verschiedene pH-Werte und Ionenstärken der Lösung. In Tab. 1 ist diejenige Menge Heparin angegeben, die jeweils eine Hemmung von $v/v_i = 1{,}1$ verursacht.

Tab. 1. Zusammenstellung der aus Abb. 3 abgelesenen Heparinmengen (in $\mu$g), die eine Hemmung der Ribonucleaseaktivität von $v/v_i = 1{,}1$ hervorrufen.

| | $\mu$ | pH 5,6 | 5,8 | 6,0 | 6,2 | 6,4 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| a) C:p | 0,020 | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 0,7 | 1,4 |
| | 0,065 | 1,05 | 1,5 | 2,0 | 3,4 | 5,5 |
| b) U:p | 0,0275 | — | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,75 |
| | 0,065 | 0,9 | 1,1 | 1,6 | 2,1 | 2,75 |

Quantitative Untersuchung auch anderer Mucopolysaccharide nach dieser Methode (Tab. 2) zeigt die Spezifität der Heparinwirkung im biologischen Bereich.

Tab. 2. Vergleich der Hemmwirkung von Mucopolysacchariden auf die Ribonuclease. Die Angaben sind Mittelwerte aus 3—7 Versuchen und beziehen sich auf Reaktionen bei pH 6,6 und $\mu = 0{,}065$. Die Ansätze enthielten in 3 *ml*: 10 $\mu$g Ribonuclease und 15 $\mu$Mol cycl. 2′.3′-Uridin-phosphat. NaOH-Verbrauch der ungehemmten Reaktion: 26,5 $\mu$Val/Min. Die Mucopolysaccharide bezogen wir von der Fa. Schering AG, Berlin.

| Inhibitor | zugesetzt [$\mu$g] | $v/v_i$ |
|---|---|---|
| Heparin (zum Vergleich) . . . . . | 10 | 1,35 |
| Hyaluronsäure . . . . . | 50 | 1,01 |
| | 100 | 0,99 |
| | 500 | 1,03 |
| Ca-Chondroitinsulfat. . . . . | 50 | 1,00 |
| | 100 | 1,03 |
| | 300 | 1,05 |
| | 1500 | 1,11 |
| Chondroitinschwefelsäure* . . . . . | 300 | 1,08 |
| Chondroitin A und B* . . . . . | 300 | 1,04 |
| Keratosulfat* . . . . . | 300 | 1,02 |

* Chromatographisch aufgetrennte Mucoidfraktionen aus der menschlichen Aortenwand, die uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Buddecke, Tübingen, überlassen wurden. Diese Angaben beruhen auf Einzelversuchen.

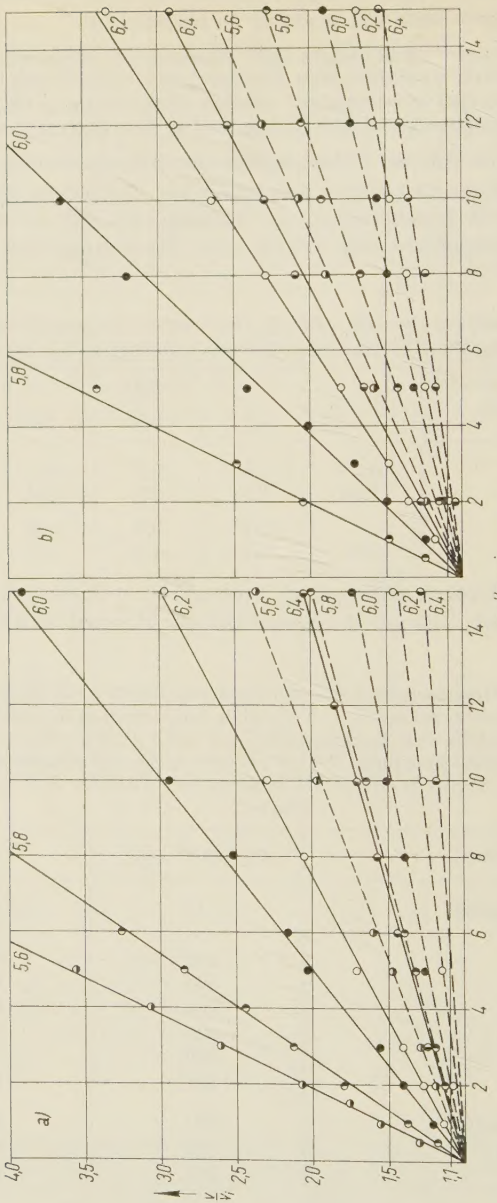


Abb. 3. Hemmung der Hydrolyse von cyclischem 2′.3′-Cytosin-phosphat (a) und 2′.3′-Uridin-phosphat (b) in Abhängigkeit der Heparinkonzentration. Die Ansätze enthielten: 10 µg Ribonuclease und 5,6 mg C:p bzw. U:p. ——: $\mu = 0{,}020$ (a), $\mu = 0{,}0275$ (b); - - - - -: $\mu = 0{,}065$. Die Zahlen an den Kurven geben die pH-Werte an.

Weitere Versuche, die ausgearbeitete Heparinbestimmungsmethode direkt auf die Verhältnisse in einer biologischen Lösung, wie z. B. Serum, zu übertragen, waren nicht erfolgreich. Es konnte jedoch eine Methode der quantitativ isolierenden Fällung von Heparin aus Serum (oder anderen eiweißhaltigen Lösungen) mit Aminoacridinen entwickelt werden, die die Bestimmung von Heparin im Serum auf enzymatischem Wege möglich macht[17]. Ein Anwendungsbeispiel der Kombination beider Methoden, auch als Kontrolle der chemischen Bestimmungsmethoden, ist dort[17] angegeben.

## Diskussion

Gegenüber den chemischen Bestimmungsmethoden von Heparin, wie die Carbazolreaktion[1] oder die Metachromasie[2], welche die Mucopolysaccharide nur gemeinsam erfassen, liegt der Wert der hier beschriebenen Methode in der Spezifität für Heparin. Gegenüber der gerinnungsphysiologischen Bestimmung darf ein Vorzug in der streng linearen Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung — auch für höhere Konzentrationen — gesehen werden, außerdem in der relativ kleinen Zahl der benötigten Komponenten, insbesondere nur eines einzigen Proteins, das leicht in hoher Reinheit zu erhalten ist. Die nach verschiedenen Parametern veränderten Bedingungen zeigen in den Abbildungen, wie direkt sich hier auf die Wechselwirkung zwischen Enzym, Substrat und Inhibitor schließen läßt, von denen jedes für sich voll definiert ist.

Damit ist die enzymatische Bestimmungsmethode besonders geeignet, die gerinnungsphysiologischen Methoden zu überprüfen, wo sie Heparinkonzentrationen bestimmen wollen. Dagegen ist sie wegen des größeren Aufwands in den Routineaufgaben weniger geeignet als diese. Die Nachweisgrenze von 0,5 $\mu$g (bei $\mu = 0{,}020$ und pH 6; in größerer Serie und pH 5,6 0,2 $\mu$g) erreicht etwa die der gerinnungsphysiologischen Methoden. Die grundsätzlich einschränkende Forderung nach einer eiweißfreien Testlösung wird durch das Fällungsverfahren mit Aminoacridinen umgangen.

Als molekulare Grundlage der Reaktion kommt die Ionenpaarbildung von Substrat $R_2O_2PO_2^{\ominus}$ bzw. Inhibitor $ROSO_3^{\ominus}$ mit dem in der Ribonuclease zentral aufgefundenen Lysin[18] in Betracht, außerdem eine gleichartige polare Bindung der benachbarten Untereinheiten des Heparins mit anderen kationischen Gruppen der Ribonuclease außerhalb des engeren Zentrums. Für ein solches „erweitertes Zentrum", mit dem sowohl das makromolekulare Substrat RNA wie der makromolekulare Inhibitor reagieren, spricht einmal die kleinere Michaelis-Konstante des RNA-Enzymkomplexes im Vergleich zu der des Komplexes mit den niedermolekularen Substraten U:p und C:p[12–14]; dann die erheblich größere Wirksamkeit von RNA beim „refolding" in Harnstofflösungen[19]; schließlich ist die Wirkung makropolyanionischer Inhibitoren wie Heparin gegenüber dem niedermolekularen Substrat[10, 14] erheblich größer.

[17] N. Zöllner, Ch. Burger u. R. Braun, diese Z. **329**, 76 [1962].

[18] W. A. Klee u. F. M. Richards, J. biol. Chemistry **229**, 489 [1957]; H. G. Gundlach, W. H. Stein u. S. Moore, ebenda **234**, 1754 [1959].

[19] C. B. Anfinsen, Federat. Proc. **16**, 783 [1957]; G. Kalnitsky, J. P. Hummel u. C. Dierks, J. biol. Chemistry **234**, 1512 [1959].

Die Reaktion von Heparin mit dem enzymatischen Zentrum der Ribonuclease kann wegen der großen Zahl in gleicher Weise wirksamer synthetischer Inhibitoren auch als unspezifisch angesehen werden; die fehlende Reaktion der übrigen Mucopolysaccharide hätte dann als Ausnahme zu gelten.

Zöllner und Fellig[3] konnten zeigen, daß die inhibitorische Wirksamkeit von Heparin durch mehrfache Kristallisation (in nichtwäßrigen Medien) fortschreitend abnimmt. Vielleicht wird durch diese Kristallisation eine geänderte räumliche Molekülstruktur fixiert und man könnte dann annehmen, daß die hemmenden synthetischen Makropolyanionen und das native Heparin (mit $\alpha$-glykosidischer Verknüpfung) in der Lage sind, sich als räumliches Negativ dem vorgegebenen strukturellen Positiv des Enzymproteins anzupassen und dabei das enzymatische Zentrum zu blockieren, während die anderen Mucopolysaccharide ($\beta$-glykosidisch verknüpft) und das kristallisierte Heparin an der nötigen räumlichen Umlagerung durch eine stabilere Eigenstruktur verhindert werden.

## Zusammenfassung

Eine enzymatische Mikromethode zur Bestimmung von Heparin neben anderen Mucopolysacchariden wird angegeben. Als Grundlage dient die Hemmung der Hydrolyse von cyclischen Pyrimidinnucleosidphosphaten durch Ribonuclease, eine im biologischen Bereich für Heparin spezifische Reaktion. Im wäßrigen, pufferfreien System können in der Mittelung über eine Serie Differenzen von 0,2 $\mu$g, im Einzelversuch von 0,5 $\mu$g Heparin gemessen werden. Die Abhängigkeit der Hemmung von der Heparinkonzentration ist linear.

## Summary

An enzymic microdetermination of heparin in the presence of other mucopolysaccharides is reported. It is based on the inhibition of the hydrolysis of cyclic pyrimidine nucleoside phosphates by ribonuclease, a reaction which is biologically specific for heparin. In aqueous, unbuffered systems, differences of 0.2 $\mu$g. of heparin can be measured in a series of determinations and 0.5 $\mu$g. in an individual determination. The dependence of inhibition on heparin concentration is linear.

*Prof. Dr. N. Zöllner, Medizinische Poliklinik der Universität, 8 München 15, Pettenkoferstraße 8a.*

# L e b e n s l a u f

Mit der entscheidenden Entwicklungsphase in die Nachkriegszeit gestellt, wuchs ich, geboren am 3. Mai 1933, auf als ältester Sohn des späteren Kaufmanns Albert Hobom und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Klaas, in einem noch ein wenig abseits gelegenen Bereich Norddeutschlands, dort wo das Land seine spannende Kargheit behält.

Zur Zeit des Abiturs 1952 an der Oberschule (später Gymnasium) Walsrode noch unentschlossen, jung, mußte mir ein erstes Semester in Göttingen -voller Zurückhaltung mit Mathematik ausgefülltdie Möglichkeit einer Orientierung geben. Und erst über die Chemie kam ich zum Studium der Medizin, beginnend im Winter 1954/1955 in Münster i.W. Nach dem Wechsel nach München habe ich hier das Physicum (April 1957) und gerade auch das medizinische Staatsexamen (Herbst 1960) abgelegt. Während dieser Zeit blieb mein Interesse auch der Chemie zugewendet.

Schon durch einen wesentlichen Teil der Famulatur auf die Medizinische Poliklinik der Universität bezogen, habe ich die vorliegenden Untersuchungen dort unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. N. Zöllner im Laboratorium in der Zeit von März 1959 bis Mai 1960 durchgeführt.